

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

# 研究報告書

研究課題名（課題番号）

comparative genomic hybridization 法と  
representational difference analysis 法を  
用いた悪性腫瘍の進展増悪に關与する  
ゲノム変異の研究  
(H10-ゲノム-007)

主任研究者： 佐藤裕子  
(国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 難治性疾患研究室)

分担研究者： 澤田賢一  
(北海道大学医学部第二内科)

別添 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

研究課題名＝comparative genomic hybridization 法と representational difference analysis (RDA) 法を用いた悪性腫瘍の進展増悪に関与するゲノム変異の研究

国庫補助金清算所要額＝30,000,000

研究期間（年度）＝1998

主任研究者名＝佐藤裕子（国立国際医療センター研究所）

分担研究者名＝澤田賢一（北海道大学医学部）

研究目的＝近年、高齢患者数が増加しており、しかも病勢増悪を阻止することにより、大幅な予後の改善が期待される慢性骨髄性白血病(CML)や骨髄異形性症候群(MDS)において、病勢増悪責任遺伝子を単離し、予後予測に役立てるほか、その遺伝子をターゲットとした遺伝子治療の開発をめざす。

研究方法＝病勢増悪時(CML急性転化時、MDS白血病移行時)検体と慢性期検体からDNAやmRNAを抽出し、RDA法を用いて、[病勢増悪時]—[慢性期]のsubtractionを行い、病勢増悪時に特異的に発現しているDNA sequenceを増幅して検出し、BLAST検索を行って候補遺伝子の同定をする。これらの候補遺伝子が実際の病勢増悪時検体で高発現しているかどうかを多数の臨床例で検討して、最終的に病勢増悪責任遺伝子を決定する。

結果と考察＝今年度は実験系の検討を行った。RDA法にはgenomic DNAを用いる方法とcDNAを用いる方法がある。前者では、ゲノムの増幅部位、欠失部位を含めたゲノム変異の全てを捉えることが可能であるが、反面、①検体が多量に必要である（制限酵素あたりDNA 10μg必要。3種の制限酵素を使いたい、それには30μg必要。この検体量は血液腫瘍患者ではかなり困難）、②<腫瘍細胞>と<正常細胞>の差を見る検査であるため、検体中に両者の混入があると結果が明瞭に出ない（混入率20%以下が望ましい。しかし、血液腫瘍患者では両者の混入のない検体を得ることは不可能）という難点がある。。そこで予備実験として、①検体必要量を減らすことが可能か、②混入率20%の検体で良好な差がでるか、を検討した。その結果、①最終段階のアンプリコンをプローブとしてコロニーのdot hybridizationを行う過程で、PCRで増幅したアンプリコンをプローブとして使用できないか試してみたが、PCR増幅するとアンプリコンの性状が修飾されてしまい、プローブとして不正確になること、つまり、検体必要量を減らすことは不可能であること、②20%の混入率でも良好な結果を出すことが困難であること、が判明した。そこで次にcDNA-RDA法を検討した。予備実験としてCML myeloid crisis時に樹立された細胞株TNCC-SとCML慢性期骨髄血プール検体を用い、両検体のsubtractionをcDNA-RDA法で行った結果、合計41個の遺伝子が検出された。この内、4個(transglutaminase、90-kDa heat-shock protein、elongation factor 2、acidic ribosomal phosphoprotein PO)はdot

## 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

### 総括研究報告書

#### comparative genomic hybridization 法と representational difference analysis 法を用いた悪性腫瘍の進展増悪に関与するゲノム変異の研究

主任研究者： 佐 藤 裕 子

（国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 難治性疾患研究室）

分担研究者： 澤 田 賢 一

（北海道大学医学部第二内科）

#### 研究要旨

本研究の目的は、近年、高齢患者数の増加がみられ、しかも病勢の急性増悪をくい止めることにより、大幅な予後の改善が期待できる血液腫瘍性疾患である慢性骨髄性白血病(CML)や骨髄異形性症候群(MDS)において、病勢増悪責任遺伝子を単離することである。

今年度は適切な実験方法の確立をめざし、①ゲノム DNA-RDA 法と cDNA-RDA 法の比較検討、及び、②differential display(DD)法との比較検討を行った。結果は、検体使用量が少なくすること、腫瘍細胞と正常細胞の混在があっても発現している遺伝子を捕らえることができることなどから cDNA-RDA 法が適切であると判断した。DD 法との比較では、どちらの方法が優れているかの結論は现阶段では早急に出せないが、DD 法は多大な労力を要し、現在の我々の研究室で行うことは不可能であるので、今後の臨床例による検討は cDNA-RDA 法で進めることにした。

现阶段では ML myeloid crisis 末梢血より樹立した細胞株（①TNCC-S）と②CML megakaryocytic crisis 臨床例で以下のような結果が得られた。①では、合計 41 個の遺伝子が検出され、この内、4 個

（transglutaminase, 90-kDa heat-shock protein, elongation factor 2, acidic ribosomal phosphoprotein PO）は dot hybridization で、肉眼的に高発現が確認された。また、5 個は新規遺伝子であり、この内、1 個は endogenous retrovirus type C oncovirus との相同性が確認された。この遺伝子は多数のコロニーで検出されたばかりか、dot hybridization でも高発現が確認された。②では、合計 31 個の遺伝子が検出され、この内、6 個は新規遺伝子であった。dot hybridization との結果を現在照合中である。この症例の場合には、芽球の性質を反映して血小板関連の遺伝子発現が多く検出されたのは興味深い。両検体で endogenous retrovirus type C oncovirus と elongation factor 2 は検出された。今後は、得られた候補遺伝子の発現量を多くの臨床例において Real-time quantitative PCR で定量し、より高頻度により高発現しているものを検出し、最終的に急性転化責任遺伝子を特定する。

MDS においては CD34 細胞の性状分析により、①白血化により末期に至る群、と②骨髄不全により末期に至る群とに分類することが可能である。今後は MDS 症例を 2 群に分けた後、CML と同様に cDNA-RDA 法により、各群に特異的な病勢増悪責任遺伝子を特定する。

#### A. 研究目的

わが国では急速な高齢化にともない高齢ガン患者が急増し、ガン治療費の高騰が健康保険財政を圧迫している。そもそも高齢ガン患者と若年ガン患者とでは、ガン治療のコンセプトが基本的に異なってい

るべきであるが（若年ガン患者には「ガン根絶をめざした治療法」、高齢ガン患者には「全身状態の悪化を最小限に留め、ガンと共存しつつ天寿を全うするような治療法」が望ましい）、現状のガン治療は無差別に行われており、この分野の研究は遅れてい

る。

本研究では高齢患者数の増加がみられ、しかも病勢の急性増悪をくい止めることができるならば、予後が著しく好転するような血液腫瘍性疾患である慢性骨髄性白血病(CML)や骨髄異形性症候群(MDS)を対象とし、病勢増悪責任遺伝子の単離をめざす。さらには病勢増悪を阻止しガンと共存しつつ天寿を全うするような治療法の開発をめざす。

## B. 研究方法

RDA法はサブトラクション法の一つであり、両者を比較して、簡便にDNAやRNAの異常を検出することが可能である。本研究ではRDA法を用いて病末期検体(CMLでは急性転化時検体、MDSでは白血病移行時検体)から病初期検体(CMLでは慢性期検体、MDSでは初診時検体)を差し引くことにより、病末期に発現している病勢増悪因子の責任遺伝子を単離する。

## C. 研究成果

平成10年度は実験系の確立を主眼として、以下のように研究を進めた。

(1) ゲノムDNA-RDA法とcDNA-RDA法の比較検討。

RDA法にはゲノムDNAを用いる方法とcDNAを用いる方法がある。前者では、ゲノムの増幅部位、欠失部位を含めたゲノム変異の全てを捉えることが可能であるが、反面、以下のような難点がある。

①検体が多量に必要である(一制限酵素あたりDNA 10 $\mu$ g 必要。3種の制限酵素を使いたい、それには30 $\mu$ g 必要。この検体量は血液腫瘍患者ではかなり困難)。

②<腫瘍細胞>と<正常細胞>の差を見る検査であるため、検体中に両者の混入があると結果が明瞭にでない(混入率20%以下が望ましい。しかし、血液腫瘍患者では両者の混入のない検体を得ることは不可能)。

そこで予備実験として、①検体必要量を減らすことが可能か(最終段階のコロニー dot hybridization を行う際に、ゲノムDNAを用いずにPCRで増幅したアンプリコンをプローブとして使用できれば、検体必要量を大幅に減らすことが出来る)、②混入率20%の検体で良好な差がでるか、を検討した。その結果は、①PCR増幅したアンプリコンをプローブとした場合、プローブの性状が修飾されてしまい、プローブして不正確になること、つまり検体必要量を減らすことは不可能であること、②20%の混入率でも良好な結果を出すことが困難であること、が判明した。

次に検体中のmRNAからcDNAを合成し、このcDNAをゲノムDNAと同様にスタート検体として

用いるcDNA-RDA法を検討した。この方法では、mRNAの発現量の差を捉えることはできるが、ゲノム変異を捉えることはできない。しかし、①必要検体量を大幅に減らすことができる(mRNA $\sim$ 1 $\mu$ gで十分)、②cDNAの消化は1種類の制限酵素を用いれば十分であり、実験操作も大幅に簡便化できる、という大きな利点がある。

予備実験としてCML myeloid crisis 末梢血より樹立した細胞株(TNCC-S)と慢性期患者末梢血プール検体(pooled CP)との差を検出を試みたところ、良好な結果が得られたため、以降はcDNA-RDA法を用いることにした。

実験方法は以下の通りである。

- 1) TNCC-S と pooled CP の total RNA より mRNA を抽出し、さらに cDNA を合成する。
- 2) 両検体の cDNA を Sau3A I で消化し、R アダプターを付加したのち R プライマーを用いて PCR で増幅し、両検体由来の「アンプリコン」を作成する。
- 3) アンプリコンより R アダプターを外し、J アダプターを付加する。
- 4) J アダプター付きの「tester 検体(差し引かれる検体)」に大過剰の J アダプターなし「driver 検体(差し引く検体)」を高い stringency でハイブリダイズさせる(「tester 検体」-「driver 検体」のサブトラクションが行われる)。この時、より明確に「TNCC-S」に発現していて、「pooled CP」に発現し、てないものを選ぶため以下のように2種類のサブトラクションを行なっておく。
  - ①「TNCC-S」 - 「pooled CP」
  - ②「pooled CP」 - 「TNCC-S」
 このハイブリダイゼーションの結果、driver 検体にはない tester 検体中の DNA 断片のみが 5' 末端に J アダプターをもつ double strand DNA となっている。
- 5) J プライマーを用いて PCR を行い、「tester 検体」にのみ存在する DNA 断片を増幅する(第1 RDA)。
- 6) J アダプターを外し、N アダプターを付ける。
- 7) N プライマーを用いて PCR を行い、非特異的 DNA 断片の増幅を避け、該当 DNA 断片をより特異的に増幅する。
- 8) PCR で増幅した DNA 断片をプラスミドに入れ込み、コロニーを作成する。
- 9) 1 サブトラクション当たり、96 個のコロニーを拾い上げ、インサート(=前回 PCR で増幅した DNA 断片)を PCR で増幅する。
- 10) PCR 産物の direct sequence を行い、BLAST search で検索して遺伝子の同定を行なう。
- 11) 2) で作成したアンプリコンをプローブとし

て、コロニーの dot hybridization を行なう。

- 1 2) 同定できた遺伝子結果と dot hybridization の結果から、「TNCC-S」に高発現しており、「pooled CP」には発現していないものを病勢増悪因子候補遺伝子とする。

## (2) cDNA-RDA 法による CML 急性転化細胞株と臨床症例での検討結果

TNCC-S では合計 41 個の遺伝子が検出された。この内、4 個 (transglutaminase、90-kDa heat-shock protein、elongation factor 2、acidic ribosomal phosphoprotein PO) は dot hybridization で、肉眼的に高発現が確認された。検出された遺伝子の中には非特異的に検出される ribosomal protein 遺伝子や HLA 関連の遺伝子も少数含まれていたが、dot hybridization では慢性期骨髓血プール検体との差が明らかではなかったものの、病勢増悪因子の候補遺伝子としての今後検討の余地があるものとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、3-phosphoglycerate dehydrogenase、calcium-independent phospholipase A2、wbscr1 and replication factor C subunit 2、erythroid ankyrin、c-myc oncogene、protein phosphatase 2A B56-epsilon、GPI-anchored protein p137、dystroglycan、putative potassium channel subunit (h-erg)、transcriptional activator (BRG-1)、transferrin receptor、Immunophilin (FKBP52)、diaphanous 1 (HDIA1)、HERC2、cell cycle progression 2 protein、cystathionine-beta-synthase などがある。また、5 個は新規遺伝子であり、この内、1 個は endogenous retrovirus type C oncovirus との相同性が確認され、この遺伝子は多数のコロニーで検出されたばかりか、dot hybridization でも高発現が確認された (表 1)。

CML megakaryocytic crisis の臨床例では、合計 31 個の遺伝子が検出され、この内、6 個は新規遺伝子であった。この内、1 個は 24 個の DNA が *C. elegans* beta-1 glucosaminyl transferase と一致していた。dot hybridization の結果との照合を現在、行っている最中である。この症例は megakaryocytic crisis であったが、芽球の性質を反映して human platelet glycoprotein IIIa、human platelet glycoprotein IIb、thrombospondin など血小板関連の遺伝子発現が検出されたのは興味深い。その他、erythrocyte plasma membrane glycoprotein、membrane glycoprotein Ib-alpha (GPIP) gene、endogenous retrovirus type C oncovirus、caldesmon、tissue inhibitor of metalloproteinase-3、mdr1、fibroblast tropomyosin TM30、elongation factor 2、cyclooxygenase 1 なども検出された (表 2)。endogenous retrovirus type C oncovirus と elongation factor 2 は両検体で検出された。

## (3) differential display(DD)法との比較検討

同時に同一検体を用いて differential display 法でも責任遺伝子の検出を試みた (委託研究: 大塚アッセイ研究所)。TNCC-S と pooled CP との比較では TNCC-S の於いて、S19 ribosomal protein mRNA、HE5 mRNA for CDw52 antigen、cytochrome C oxidase subunit Vb mRNA、metastasis suppressor gene、MHC protein homologous to chicken B complex protein mRNA、colin carcinoma laminin-binding protein mRNA、amino exchange protein 2、GT335 mRNA、elongation factor 1-gamma、4F5 rel mRNA が高発現していた (表 3)。cDNA-RDA 法と DD 法の両方で検出された遺伝子は一つも見られなかった。

## D. 考察

病勢増悪因子単離法として、どちらの方法が優れているかの結論は現段階では早急に出せない。しかし、DD 法は多大な労力を要するので現在の我々の研究室で行うことは不可能であり、今後の臨床例による検討は cDNA-RDA 法で進めることにした。

## E. 結論

cDNA-RDA 法は簡便に行えるサブトラクション法であり、病勢増悪因子候補遺伝子を検出するのに適切な方法であることが判った。今後は以下の方針でさらに研究を進める。

1. 慢性骨髓性白血病
  - 1) 多くの急性転化症例でこれらの候補遺伝子の発現量を Real-time quantitative PCR で定量し、より高頻度により高発現しているものを最終的に急性転化責任遺伝子として特定する。
  - 2) 更に多くの CML 急性転化臨床検体で検出された病勢増悪因子候補遺伝子がどの程度に、どのような頻度で発現しているかを検討する。
  - 3) 病勢増悪因子遺伝子群の DNA チップ・パネルを作成する。

## 2. 骨髓異形性症候群

分担研究者: 澤田らによれば、骨髓異形性症候群では造血幹細胞の性状を分析することで本症候群を大きく 2 群に、①白血化により末期に至る群、と②骨髓不全により末期に至る群とに分類することが可能である (Sawada K, et al.: Blood 85:194-202, 1995、Sawada K, et al.: Leukemia & Lymphoma 29:49-60, 1998)。2 群に分けた後、CML と同様に、cDNA-RDA 法により、最終的に病勢増悪責任遺伝子を特定する。

## F. 研究発表

## 1) 論文発表

1. Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new *ETV6(TEL)* partner gene, *ARG* (*ABL* related gene or *ABL2*) identified in a AML-M3 cell line with the t(1;12)(q25;p13) translocation, submitted
2. Sato Y, Kobayashi H, Suto Y, Davis EM, Super HG, Espinosa III R, Le Beau MM, Bohlander SK, Rowley JD: Genetic instability in the Band 12p13: Multiple chromosomal breaks occur resulting in formation of complicated chromosomal rearrangements and a subclone which has the different breakpoints but the same karyotype as the main clone, submitted
3. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Suzuki K, Morishita K, Sato Y, Kudo S, Tanaka K, Nagamura F, Asano S, Kamada N: Fusion of the *ETV6* to neutrophin-3 receptor *TrkC* in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 93:1355-1363, 1999.
4. Tarumi T, Sawada K, Koike T, et al.: A pilot study of a response oriented chemotherapeutic regimen combined with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, in press
5. Koizumi K, Sawada K, Koike T, et al.: In vitro expansion of CD34+/CD41+ cells from human peripheral blood CD34+/CD41- cells: Role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors. *Exp Hematol* 26:1140-47, 1998.
6. Sawada K, Koizumi K, Koike T, et al.: Role of physiological concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukemia Res* 23:1-11, 1998.
7. Nishio H, Suda T, Sawada K, Miyamoto T, Koike T, Yamaguchi Y: Molecular cloning of cDNA encoding hman Rab3D whole expression is upregulated with myeloid differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1444:283-290, 1999.
8. Ieko M, Yasukouchi T, Sawada K, Koike T:  $\beta$ 2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis and Rheumatism* 42:167-174, 1999.
9. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T: The influence of  $\beta$ 2-glycoprotein I on tissue factor activity. *Semin Thrombo Hemostat* 24:211-215, 1998
10. Nishio M, Sawada K, Koike T, et al.: Recurrence with histological transformation 40 days after autologous peripheral blood stem cell transplantation (APBSCIT) for cutaneous CD34-negative large T-cell lymphoma. *Bone marrow Trans plant* 22:1211-14, 1998.
11. Oda A, Sawada K, Druker BJ, Ozaki K, Takano H, Koizumi K, Fukada Y, Handa M, Koike T, Ikeda Y: Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors. *Blood* 92:443-51, 1998.
12. Notoya A, Sawada K, Ieko M, Tarumi T, Koizumi K, Fukada Y, Sato N, Yasukouchi T, Koike T: Subclinical alterations in coagulation and fibrinolysis in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia & Lymphoma* 28:405-13, 1998.
13. Sawada K: Growth characteristics of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukemia & Lymphoma* 29:49-60, 1998.
14. Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S: Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle. *Blood* 92:842-8, 1998.

## 1. 学会発表

1. Kogure K, Urabe M, Kume A, Sato Y, Ozawa K: Site-specific integration of a foreign gene to AAVS1 locus on chromosome 19 in hematopoietic cell using AAV-derived component. The 40th Annual Meeting of American Society of Hematology, in Miami Beach, Dec. 4-8, 1998.
2. Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi E, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new partner gene of the *ETV6/TEL*, *ARG* (*ABL* related gene, or *ABL2*) cloned in a AML-M3 cell line with t(1;12)(q25;p13). The 40th Annual Meeting of American Society of Hematology, in Miami Beach, Dec. 4-8, 1998.
3. Eguchi M, Tojo A, Setoyama M, Ishimae M, Morishita K, Sato Y, Asano S, Kamada N: Fusion of

the ETV6 to the TrkC produced novel transforming tyrosine kinase in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). The 40th Annual Meeting of American Society of Hematology, in Miami Beach, Dec. 4-8, 1998.

4. 飯嶋良味、伊藤隆司、及川恒之、江口真理子、石前峰斉、鎌田七男、岸 賢治、榊 佳之、佐藤裕子：t(1;12)(q25;p13)転座で確認された TEL/ETV6 遺伝子のパートナー遺伝子、ABL2。第60回日本血液学会総会、大阪、1998年3月25-27日
5. 澤部順子、吉田弘喜、三国主税、岸 賢治、北野喜良、東條有伸、渡 潔、浅野茂隆、佐藤裕子：major および minor BCR/ABL mRNA を同時発現している CML 症例のクロナリティの解析。第60回日本血液学会総会、大阪、1998年3月25-27日
6. 石前峰斉、江口真理子、東條有伸、浅野茂隆、佐藤裕子、鎌田七男：造血器腫瘍の細胞遺伝学的ならびに分子生物学的研究（73報）12番染色体短腕に異常を有する造血器腫瘍の TEL 遺伝子の解析。第60回日本血液学会総会、大阪、1998年3月25-27日
7. 江口真理子、石前峰斉、久藤しおり、田中公夫、森下和宏、佐藤裕子、長村文孝、東條有伸、浅野茂隆、鎌田七男：造血器腫瘍の細胞遺伝学的ならびに分子生物学的研究（74報）12;15転座における TEL 遺伝子と Trk 遺伝子の融合。第60回日本血液学会総会、大阪、1998年3月25-27日
8. 江口真理子、石前峰斉、久藤しおり、田中公夫、森下和宏、佐藤裕子、東條有伸、浅野茂隆、鎌田七男：造血器腫瘍細胞の細胞遺伝学的ならびに分子生物学的研究（76法）新しい転座融合遺伝子 TEL-TrkcC の構造と局在。第57回日本がん学会総会、横浜市、1998年9月30-10月2日
9. 飯嶋良味、伊藤隆司、及川恒之、江口真理子、石前峰斉、鎌田七男、岸 賢治、榊 佳之、佐藤裕子：t(1;12)(q25;p13)転座で確認された TEL/ETV6 遺伝子のパートナー遺伝子、ARG(ABL2)-第二報。第43回日本人類遺伝学会、甲府市、1998年10月14-16日
10. 江口真理子、石前峰斉、久藤しおり、田中公夫、鎌田

七男、長村文孝、東條有伸、浅野茂隆、森下和宏、佐藤裕子：急性骨髄性白血病に見られた新たな TEL 遺伝子関連転座 t(12;15) と TEL-TrkcC 融合遺伝子の同定。第43回日本人類遺伝学会、甲府市、1998年10月14-16日

11. 中里 洋、村上晃司、竹田津文俊、藤沢 信、山崎悦子、矢ヶ崎史治、別所正美、石本浩市、南久松真子、篠原多美子、田中英夫、木村昭郎、佐藤裕子：MDSに良く認められる t(1;3)(p36;q21)転座 1p36 切断点の FISH 法解析。第40回日本臨床血液学会総会、金沢市、1998年11月11-13日
12. 塩崎宏子、松本久美子、高田 覚、佐倉 徹、宮脇 修一、中里 洋、佐藤裕子：赤血球貪食と del(20)(q11.2113.3)を認めた MDS の一例。第40回日本臨床血液学会総会、金沢市、1998年11月11-13日
13. 竹迫直樹、三輪哲義、山内弥生、荒井ちあき、白井裕子、神田善伸、佐藤裕子、湯尾 明、戸川 敦：悪性リンパ腫における末梢血由来 double purged cell, CD35<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 細胞純化法の開発。第40回日本臨床血液学会総会、金沢市、1998年11月11-13日

## G. 私的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

現在のところ、取得なし。

### 2. 実用新案登録

現在のところ、取得なし。

### 3. その他

なし。

表 1

＜細胞株 TNCC-S と慢性期プール検体との比較＞

[TNCC-S] – [pooled CP]で発現亢進の見られた遺伝子群

(●は特に発現差の大きいもの)

	gene name	Accession No.	Identified sequence position	Clone No.
1	●transglutaminase(TGase)	M17885	203-371	H7
			896-1104	C11
			2046-2241	C4
2	●90-kDa heat-shock protein (HSP 90)	M16660	213-376	B10, C9, D5
			646-746	G5
			1027-1240	B7
3	●elongation factor 2	X51466	616-880	A2, B9, B12, C12, D1, E11, F4, F6, H3, H8
			1059-1287	B1, F9, G1, G6
			2244-2457	B6, C2, C4, C8, D9, E8
4	●acidic ribosomal phosphoprotein PO	M33197	203-498	A1, A8, C8, G3, H2
5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	M33197	301-498	A1
6	3-phosphoglycerate dehydrogenase	AF006043	754-945	D9
7	calcium-independent phospholipase A2	AF0645994	650-946	A5
8	wbscr1 and replication factor C subunit 2 (RFC2)	AF045555	16998-17132	B4
9	erythroid ankyrin	M28880	2520-2672	B7
10	reelin (RELN)	U79716	9002-9238	C9
			9618-9802	B8, E2
11	c-myc oncogene	V00568	1397-1566	B11, D7, E3, E4, E10, F11
			1826-1956	B8, G9
12	protein phosphatase 2A B56-epsilon(PP2A)	L76703	563-814	B10
13	GPI-anchored protein p137	Z48042	1198-1438	C1
14	dystroglycan (DAG1)	L19711	2170-2416	C2
15	poly (ADP-ribose) polymerase	M32721	1756-1947	C6
16	putative potassium channel subunit (h-erg)	U04270	1801-2100	C7
17	transcriptional activator (BRG-1)	U29175	2352-2589	C10
18	transferrin receptor	M11507	314-571	E5
19	Immunophilin (FKBP52)	M88279	312-523	H6
			520-697	F1, G7, B5
20	diaphanous 1 (HDIA1)	AF051782	2968-3109	F3
21	HERC2	AF071172	7195-7444	F5, G4
22	cell cycle progression 2 protein (CPP2)	AF011792	652-835	F7
23	HnRNP F protein	L28010	4-191	F7
24	cystathionine-beta- synthase (CBS)	L00972	1631-1796	G3
25	autoantigen pericentriol material 1 (PCM-1)	L27841	908-1088	G5
26	calucium-ATPase (HK1)	M23114	1792-1964	G8
27	HLA-B-associated transcript 2 (BAT2)	M33509	3695-3768	C10
28	ribosomal protein S5	U14970	131-334	G4, G8
29	ribosomal protein S18	X69150	58-250	D2, G11



表 1

30	28S ribosomal gene	M11167	2325-2486	D3
31	ribosomal protein L11	L05092	13-179	E9
32	ribosomal protein L27a	U14968	142-246	H3
33	KIAA 0018	D13643	539-726	D8
34	KIAA 0528	AB011100	485-746	E6
35	KIAA0595	AB011167	3925-4086	H7
36	KIAA0747	AB018290	2020-2268	F9

## Novel sequence

	homologue	homologous region	clone No.	accession No.
1	●endogenous retrovirus type C oncovirus	4974-4723 6804-7122 7147-7298	A4, B9, C12, D4, F10, H4 A6, B4, F2, G1, G6, G7, H1, H2 E7, F8	M74509
2	CALO protein( <i>Drosophila melanogaster</i> )	846-911*	C3	e1353322*
3	notchless (nle) ( <i>Xenopus laevis</i> )	525-664	C5	AF069737
4	coronin-like protein ( <i>H. sapiens</i> ) ( <i>Rattus norvegicus</i> )	111-191* 112-190*	G10	p31146* e1331790
5	Sprague-Dawley SM-20 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) ( <i>H. sapiens</i> CpG DNA)	778-908 (107-324)	E12	U06713 (Z64069)

\* protein accession No

表 2

<CML-Meg crisis 臨床検体(K.N)と慢性期プール検体との比較>

[K.N] - [pooled CP]で発現亢進の見られた遺伝子群

	gene name	Accession No.	Identified sequence position	Clone No.
1	erythrocyte plasma membrane glycoprotein	X64594	1524-1842	A1, A3, A4, A6, A7, A11, A12, B6, B8, B10, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C11, D3, D4, D6, D8, D9, E8, E9, E11, F8, F10, G2, G5, G6, G8, G9, H1, H2, H3, H5, H8
2	membrane glycoprotein Ib-alpha (GPIIb) gene	W22403	4873-5119	B1
3	Human platelet glycoprotein IIIa (GP IIIa)	M35999	4229-4355	D5
4	Human platelet glycoprotein IIb (ITGA2B)	J02764	1007-(1084)	D11
5	thrombospondin	X14787	4336-4606	A8, E4, G7
			4630-4673	
			3258-3620	F3
			4294-4572	F11
6	endogenous retrovirus type C oncovirus	M74509	(7149)-7284	A7
7	caldesmon	M64110	1447-(1772)	B4
8	immunophilin (FKBP52)	M88279	520-697	B5, H9
9	immunoglobulin light chain	D87018	2031-2300	B9
10	Mut S homolog 5 gene	AF129756	24958-25088	B12, E5
11	membrane transport protein	Z32684	2771-3104	D1
12	myosin light chain kinase	X85337	1722-2030	E1
13	hypothetical protein (L1H 5' region)	A34087	144-252*	E2
14	prepromultimerin	U27109	2012-2355	E7
15	tissue inhibitor of metalloproteinase-3	U14394	(416)-728	F2
16	mdr1	X78081	1504-1546 2787-2828	F6
17	fibroblast tropomyosin TM30	X05276	507-763	F12
18	preprimultimerin	U27109	2012-2355	H4
19	DJ0811N16	ACO04897	48165-48477	H6
20	elongation factor 2	X51466	2244-2457	H11
21	cyclooxygenase 1 (PTSG 1)	U63846	1674-1783	H12
22	KIAA0473	AB007942	4629-5036	A2, A9, B7, B11, C10, C12, D2, D10, F7, G3, H7, H10
23	KIAA0420	AB007880	2303-2489	F5
24	KIAA0422	AB007882	4694-5040	D12
25	satellite III DNA	X60726	3-79 175-348	A5

表 2

## Novel sequence

	counter part/homologue gene	accession No.	ORF	Sequence homologous region	clone No.
1	C. elegans weak similarity with beta-1 glucosaminyl transferase	CAA85324		22-45*	A2
2			110bp		A4
3			320bp		B10
4			140bp		C4
5			70bp		E1
6			130bp		E11

\* protein accession No

## Differential Display 法による CML の慢性期と急性転化時発現遺伝子の比較

Band No.	Gene name	B P				C P				Score bits	No. of Clone	Homology	Accession No.
		1 根本	2 亀田	3 TNC CS	4 金井	5 工藤	6 CP PB	7 CP BM	N PB				
2	H. sapiens S19 ribosomal protein mRNA	+	-	3+	-	-	-	+	-	494	2	identical	M81757
6	H. sapiens HES mRNA for CDw52 antigen	2+	-	3+	-	-	-	-	-	363	1	identical	X67699
26	Human sphingolipid activator protein mRNA	-	-	-	-	-	-	2+	-	206	1	identical	D00422
	Human Bcl-2 related (Bfl-1) mRNA									196	1	identical	U27467
36	Human cytochrome C oxidase subunit Vb mRNA	-	+	3+	-	-	-	-	-	686	2	identical	M19961
44	Human metastasis suppressor (KAI 1) gene	3+	+	3+	-	-	-	-	-	301	1	identical	U67274
	Human R2 mRNA for an inducible membrane protein									529	1	identical	X53795
55	Human MHC protein homologous to chicken B complex protein mRNA	-	-	+	-	-	+	-	-	791	1	identical	M24194
59	Human colin carcinoma laminin-binding protein mRNA	+	-	3+	-	-	+	-	-	811	4	identical	J03799
	Gallus gallus single-strand DNA-binding protein csdp mRNA									394	1	homologous	U68380
65	H. sapiens amino exchange protein 2 (AE2)	3+	+	3+	-	-	+	-	-	226	1	identical	X62137
76	Human GT335 mRNA	-	-	2+	-	-	-	-	-	214	1	identical	U53003
83	H. sapiens elongation factor 1-gamma	-	-	2+	-	-	-	-	+	424	1	identical	X63526
89	H. sapiens 4F5 rel mRNA	2+	+	3+	-	-	-	-	-	783	2	identical	AF073298
	H. sapiens sds 22 like mRNA									795	1	identical	Z50749
90	H. sapiens BAC clone NH0121A08	3+	3+	2+	-	-	-	+	-	646	2	identical	AC006033
99	H. sapiens BAC clone NH0335J18	-	2+	-	-	-	+	+	-	113	1	identical	AC005539
103	Human galactocerebrosidase	+	+	2+	-	-	3+	3+	-	238	1	identical	D25283
114	H. sapiens vascular endothelial growth factor mRNA	+	+	3+	-	-	-	+	-	170	1	identical	AF022375
151	H. sapiens ung gene for uvacil DNA-glycosylase	-	-	3+	-	-	-	-	-	502	1	identical	X89398
177	Human ferritin H chain mRNA	+	+	+	-	-	2+	+	-	741	3	identical	M11146
161	mitochondrial DNA	2+	2+	+	-	-	-	+	-	436	10	identical	V00662

## 分担研究報告書

### comparative genomic hybridization 法と representational difference analysis 法を用いた悪性腫瘍の進展増悪に関与するゲノム変異の研究

分担研究者： 澤 田 賢 一  
（北海道大学・医学部第二内科）

#### 研究要旨

本研究の目的は骨髄異形成症候群(MDS)における病勢増悪因子遺伝子を単離することである。我々はこれまでに MDS はコロニー分析により、①増殖型=白血病移行死と ②非増殖型=骨髄不全死に大きく分類できることを明らかにしてきた。今年度は、さらに細胞表面形質の解析やサイトカイン反応性の解析により、MDS 芽球の特異な性状として、①内因性欠陥に基づいて G-CSF に対する反応性の異常を有すること、②G-CSF などの造血因子に反応して増殖するが分化傾向に乏しいこと、③CD13 を主とする表面形質の発現異常を有すること、④増殖型と非増殖型の 2 型に分かれ、生体内において、増殖型芽球は stem cell factor によって増殖優位性を獲得し、非増殖型芽球は既知の造血因子非依存性に増殖すること、を明らかにした。今後は RDA 法により、こうした特異な性状を惹起する責任遺伝子の同定を目指す。

#### A. 研究目的

本研究の目的は骨髄異形成症候群(MDS)における病勢増悪因子遺伝子を単離することである。

MDS は多能性幹細胞の腫瘍性疾患であり、無効造血と異常細胞の多段階発癌による白血病移行を特徴とする。近年、患者数が増加しているにも拘わらず、分子病態は不明であり有効な治療法はない。造血幹細胞移植が唯一の治癒的治療法であるが、高齢患者が多いために同種骨髄移植の適応となるのは稀であり、多くは骨髄不全死あるいは白血化の後、死に至る。また、臨床経過は症例によって様々であり、治療効果も様々であるので、分子病態も heterogenous であると推測されている。我々のこれまでの研究では MDS はコロニー分析により、①増殖型=白血病移行死と②非増殖型=骨髄不全死に大きく分類できるが、芽球(CD34+細胞)の性状解析により、さらに細分類し、それに関連する遺伝子を同定できたならば、治療の選択・予後予測のうえでも、さらには分子病態に基づく遺伝子治療開発の上でも、大いに役立つに違いない。本研究における当方の分担は MDS 芽球の性状解析である。

#### B. 研究方法

患者検体は RDA 法検索と芽球性状解析の両方に必要であり、検体量も多量を必要とするので、基本的に

は芽球性状解析の終わった症例から再度検体を採取して主任研究者に送り、RDA 法検索を行う。

(1) MDS 芽球(CD34+細胞)の純化とコロニーアッセイ：血清含有培地、無血清培地は既報の如く行ない MDS 芽球の増殖様式を決定する。形態学的なコロニー分類は一般に認められているが、さらに客観的指標による裏付けを行う。液体培養による CD34+細胞の絶対数と比率の増加が増殖型 MDS 芽球の客観的指標であるが、液体培養のみでは個々の芽球の増殖能力を観察することはできない。細胞標本を染色後に凍結保存し、通常の染色体分析の結果が判明してから FISH 解析を行って、CD34+細胞中の染色体異常を有する芽球の比率を決定する。

(2) 細胞表面形質の解析：コロニー形成に拠らない増殖様式分類の確率を目指す。CD34, Thy-1, c-kit, CD13, CD33, CD38 の他、VLA-4 などの接着因子にも注目して検討を進める。ALAS-E, GATA-1 の解析を通して生化学的側面から無効造血の機序を解析する。細胞の凍結保存を行い、上記の結果を解析して MDS 芽球の CD34 亜分画の絞りこみを行う。CD34 亜分画を採取して、無血清培地による増殖型の確認と FISH による染色体分析を行い MDS 芽球を同定する。

**C. 研究成果**

正常幹細胞や前駆細胞の成熟段階はその増殖能、分化能と表面形質に基づいて決定するが、MDS 幹細胞は増殖と分化の異常を呈するため、正常幹細胞との対比が極めて困難であった。この点を解決するために、我々は CD34 を指標として MDS 患者骨髄より MDS 芽球を純化し、その成熟段階を予め規定する方法で種々の解析を行ってきた。

その結果、MDS 芽球は、①内因性欠陥に基づいて G-CSF に対する反応性の異常を有すること、②G-CSF などの造血因子に反応して増殖するが分化傾向に乏しいこと、③CD13 を主とする表面形質の発現異常を有すること、④増殖型と非増殖型の 2 型に分かれ、生体内において、増殖型芽球は stem cell factor によって増殖優位性を獲得し、非増殖型芽球は既知の造血因子非依存性に増殖することを明らかにした。また、赤血球分化におけるヘム合成酵素 ALAS-E 発現の意義を明らかにするとともに、臨床的には、健常ヒト造血幹細胞の in vitro 増幅と in vivo 増幅について諸条件を検討し、血液悪性腫瘍に対する化学療法、化学療法併用/末梢血幹細胞動員・採取法、採取幹細胞の自家移植療法、CD34+ 細胞の大量純化法を開発した。

**D. 考察と結論**

コロニーアッセイ、細胞表面形質の解析、サイトカイン反応性の解析を通じて、正常細胞とは異なる MDS 幹細胞特有の種々の性状が明らかとなった。

本年度は主任研究者が適切な RDA 実験法の検討に時間がかかったために、MDS 検体については、RDA 法による検討を行えず、芽球の性状解析に留まったが、来年度は性状解析の済んだ臨床検体を主任研究者に送り、これらの異常な性状を惹起する責任遺伝子の同定に迫る。

**E. 研究発表**

1. Tarumi T, Sawada K, Koike T, et al.: A pilot study of a response oriented chemotherapeutic regimen combined with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, in press
2. Koizumi K, Sawada K, Koike T, et al.: In vitro expansion of CD34+/CD41+ cells from human peripheral blood CD34+/CD41- cells: Role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors. *Exp Hematol* 26:1140-47, 1998.
3. Sawada K, Koizumi K, Koike T, et al.:

Role of physiological concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukemia Res* 23:1-11, 1998.

4. Nishio H, Suda T, Sawada K, Miyamoto T, Koike T, Yamaguchi Y: Molecular cloning of cDNA encoding hman Rab3D whole expression is upregulated with myeloid differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1444:283-290, 1999.
5. Ieko M, Yasukouchi T, Sawada K, Koike T:  $\beta$ 2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis and Rheumatism* 42:167-174, 1999.
6. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T: The influence of  $\beta$ 2-glycoprotein I on tissue factor activity. *Semin Thrombo Hemostat* 24:211-215, 1998
7. Nishio M, Sawada K, Koike T, et al.: Recurrence with histological transformation 40 days after autologous peripheral blood stem cell transplantation (APBSCT) for cutaneous CD34-negative large T-cell lymphoma. *Bone marrow Transplant* 22:1211-14, 1998.
8. Oda A, Sawada K, Druker BJ, Ozaki K, Takano H, Koizumi K, Fukada Y, Handa M, Koike T, Ikeda Y: Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors. *Blood* 92:443-51, 1998.
9. Notoya A, Sawada K, Ieko M, Tarumi T, Koizumi K, Fukada Y, Sato N, Yasukouchi T, Koike T: Subclinical alterations in coagulation and fibrinolysis in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia & Lymphoma* 28:405-13, 1998.
10. Sawada K: Growth characteristics of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukemia & Lymphoma* 29:49-60, 1998.
11. Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S: Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle. *Blood* 92:842-8, 1998.

**G. 私的所有権の取得状況**

1. 特許取得・実用新案登録・その他  
現在のところ、取得なし。

19980395

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

**研究成果の刊行に関する一覧表**

**Fusion of ETV6 to Neurotrophin-3 Receptor TRKC in Acute Myeloid Leukemia with t (12;15)(p13;q25)**

Mariko Eguchi, Minenori Eguchi-ishimae, Arinobu Tojo...  
Blood 93(4) 1999 P.1355-1363

**In vitro expansion of CD34/CD41 cells from human peripheral blood CD34/CD41 cells: Role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors**

Kazuki Koizumi, Ken-ishi Sawada, Miki Yamaguchi...  
Experimental Hematology 26 P.1140-1147 1998

**Role of physiologic concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34 cells**

Ken-ichi Sawada, Kazuki Koizumi, Takashi Tarumi ...  
Leukemia Research 23 P.1-11 1999

**Molecular cloning of cDNA encoding human Rab3D whose expression is upregulated with myeloid differentiation**

Hitoshi Nishio , Toshio Suda , Ken-ichi Sawada...  
Biochimica et Biophysica Acta 1444 P.283-290 1999

**$\beta$  2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies.**

Ieko M, Yasukouchi T, Sawada K...  
Arthritis and Rheumatism 42(1) P.167-174 1999

**The Influence of  $\beta$  2-glycoprotein I on Tissue Factor Activity**

Masahiro Ieko, Taro Yasukouchi ...

Semin Thrombo Hemostat 24(3) P.211-215 1998

**Recurrence with histological transformation 40 days after autologous peripheral blood stem cell trasplantaion (APBSCT) for cutaneous CD30-negative large T cell lymphoma**

M Nishio, K Sawada, K Koizumi...

Bone Marrow Transplantaion 22 P.1211-1214 1998

**Erythropoietin Induces Tyrosine Phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in Primary Cultured Human Erythroid Precursors**

Atushi Oda, Kenichi Sawada, Brian J....

Blood 92(2) P.443-451 1998

**Different Adhesive Characteristics and VLA-4 Expression of CD34 Progenitors in G0/G1 versus S+ G2/M phases of the cell cycle**

Miki Yamaguchi Kenji Ikebuchi Fumiya Hirayama....

Blood 92(3) P.842-848 1998